



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 296 757 A5

Erteilt gemäß §.17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27.10.1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) G 01 N 21/17

## DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD G 01 N / 342 978 4

(22) 23.07.90

(44) 12.12.91

(71) siehe (73)

(72) Berlin, Peter, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Becker, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Güther, Reiner, Dr. sc. nat. Dipl.-Phys.; Breinfeld, Dagmar; Schwachula, Gerhard, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Feistel, Lothar, Dipl.-Chem., DE

(73) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE

(74) Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE

(54) Faseroptische Meßvorrichtung

(55) Meßvorrichtung, faseroptische; Diagnostik, medizinische; Reagensphase; Element, optisch wirksames; Übertragungseigenschaften, optische; Lumineszenzeigenschaften; Reagensträger; Indikatorsystem; Biokomponente  
(57) Die Erfindung betrifft eine faseroptische Meßvorrichtung zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen. Die faseroptische Meßvorrichtung kann insbesondere in der medizinischen Diagnostik, z. B. bei in vivo- oder in vitro-Messungen, in der Umwelt- bzw. Nahrungsmittelanalytik und in der chemischen bzw. biotechnologischen Prozeßkontrolle eingesetzt werden. Erfindungsgemäß ist die faseroptische Meßvorrichtung dadurch gekennzeichnet, daß

- mindestens eine Faseroptik und mindestens eine Reagensphase ein optisches System bilden,
- die Reagensphase optisch wirksames Element und/oder fluoreszierendes Element innerhalb des optischen Systems ist,
- die Reagensphase bei Einwirkung des Analyten ihre optischen Übertragungseigenschaften und/oder ihre Lumineszenzeigenschaften ändert,
- die Reagensphase aus einem Reagensträger oder aus einem Reagensträger, immobilisierte(n) Biokomponente(n) und/oder Indikatorsystem besteht,
- die Reagensphase in der faseroptischen Meßvorrichtung austauschbar positioniert ist und
- ihre Positionierung reproduzierbar ist.

Die Vorteile der erfindungsgemäßen faseroptischen Meßvorrichtungs-Prototypen bestehen darin, daß sie kostengünstig und miniaturisierbar sind und darüber hinaus Analyt-spezifische, leicht auswechselbare Reagensphasen aufweisen, wodurch nicht-reversible Indikatorreaktionen ausgenutzt werden können.

# Patentansprüche:

1. Faseroptische Meßvorrichtung zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen, bestehend aus Faseroptik und Reagensphase, optisch gekoppelt in einer Meßanordnung mit einer Lichtmeßeinrichtung, die Strahlungsquelle(n), Lichtempfängeranordnung und Registriereinrichtung umfaßt, **gekennzeichnet dadurch, daß**
  - mindestens eine Faseroptik und mindestens eine Reagensphase ein optisches System bilden,
  - die Reagensphase optisch wirksames Element und/oder fluoreszierendes Element innerhalb des optischen Systems ist,
  - die Reagensphase bei Einwirkung des Analyten ihre optischen Übertragungseigenschaften und/oder ihre Lumineszenzeigenschaften ändert,
  - die Reagensphase aus einem Reagensträger oder aus Reagensträger, immobilisierte(n) Biokomponente(n) und/oder Indikatorsystem besteht,
  - die Reagensphase in der faseroptischen Meßvorrichtung austauschbar positioniert ist und
  - ihre Positionierung reproduzierbar ist.
2. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Reagensphase ein Transmissionselement in Form einer Linse, eines Prismas oder eines Gitters ist.
3. Meßvorrichtung nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Reagensphase als Linse die Form einer Kugel hat.
4. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Reagensphase eine lichtundurchlässige und lumineszierende Reagensphase oder eine nach Einwirkung des Analyten lumineszierende Reagensphase ist.
5. Meßvorrichtung nach Anspruch 4, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Reagensphase die Form einer Kugel hat.
6. Meßvorrichtung nach Anspruch 1-5, **gekennzeichnet dadurch, daß** zwischen Reagensphase und einkoppelnder Faseroptik optische Elemente, die keine Reagensphasen sind, eingebaut sind.
7. Meßvorrichtung nach Anspruch 6, **gekennzeichnet dadurch, daß** die optischen Elemente Linsen oder holographische Linsen sind.
8. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß** das optische System als Reflexionselement einen Spiegel oder ein an einem Ende verspiegeltes Faseroptikstück aufweist.
9. Meßvorrichtung nach Anspruch 1-3 und 8, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Reagensphase als Transmissionselement die Form einer Kugel hat, der reflektierende Spiegel konkav ist, sein Krümmungsmittelpunkt im Zentrum der Reagensphasenkugel liegt und die Reflexion in die einkoppelnde Faseroptik erfolgt (Fig. 3).
10. Meßvorrichtung nach Anspruch 9, **gekennzeichnet dadurch, daß** der Spiegel auf eine an die Reagensphasenkugel passende Konvex-Konkav-Linse aus lichtdurchlässigem Material aufgebracht ist.
11. Meßvorrichtung nach Anspruch 10, **gekennzeichnet dadurch, daß** das lichtdurchlässige Material elastisches Gießharz ist.
12. Meßvorrichtung nach Anspruch 10 und 11, **gekennzeichnet dadurch, daß** das lichtdurchlässige Material auch oder anstelle der Reagensphasenkugel Biokomponente(n) und/oder Indikatorsystem enthält.
13. Meßvorrichtung nach Anspruch 10, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Konvex-Konkav-Linse mit der Reagensphase verbunden ist.
14. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, 2, 6 und 8, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Reagensphase als Transmissionselement die Form eines Gitters hat, das mit einem Spiegel hinterlegt ist, zwischen Reagensphase und einkoppelnder Faseroptik sowie zwischen Reagensphase und auskoppelnder Faseroptik das gleiche optische Element zur Kollimation der von der Faseroptik ausgehenden Strahlung und zur Fokussierung der reflektierten, spektral zerlegten Strahlung eingebaut ist und die Reflexion je nach Spektralfarbe in mehrere auskoppelnde Faseroptiken erfolgt (Fig. 5).
15. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß** das optische System einen Laserresonator enthält, wobei die Reagensphase anstelle des aktiven Mediums vorliegt.
16. Meßvorrichtung nach Anspruch 1-3, **gekennzeichnet dadurch, daß** die Reagensphase ein Transmissionselement in Form einer Kugel mit Lumineszenzeigenschaften ist, als Reflexionselement ein Spiegel eingebaut ist, zwischen Reagensphase und einkoppelnder Faseroptik ein optisches Element vorhanden ist und die Reflexion in die einkoppelnde Faseroptik erfolgt (Fig. 4).

17. Meßvorrichtung nach Anspruch 1-3, **gekennzeichnet dadurch**, daß das optische System kein Reflexionselement enthält und aus einkoppelnder Faseroptik, kugelförmiger Reagensphase und auskoppelnder Faseroptik besteht.
18. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die auskoppelnde Faseroptik Gradientenfasern, Faserbündel oder Hohlaserbündel enthält.
19. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die faseroptische Meßvorrichtung die Form eines Meßfühlers hat.
20. Meßvorrichtung nach Anspruch 1-5 und 19, **gekennzeichnet dadurch**, daß die faseroptische Meßvorrichtung ein miniaturisierter, gegebenenfalls sterilisierbarer, Meßfühler ist und die kugelförmige Reagensphase einen Durchmesser kleiner 2 mm hat.
21. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Reagensträger aus  $\text{NH}_2$ - oder DH-funktionalisierten Glasformkörpern besteht.
22. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Reagensträger aus organischen Polymeren besteht.
23. Meßvorrichtung nach Anspruch 22, **gekennzeichnet dadurch**, daß die organischen Polymere Polystyrolerivate, Polyacrylnitrile, Poly(meth)acrylate, Poly(meth)acrylamide oder Polyvinylalkohole sind.
24. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Reagensträger aus makromolekularen Verbindungen besteht.
25. Meßvorrichtung nach Anspruch 24, **gekennzeichnet dadurch**, daß die makromolekularen Verbindungen Kollagene oder Polysaccharidderivate sind.
26. Meßvorrichtung nach Anspruch 23, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Reagensträger eingesetzte Polystyrolerivate Gel- oder Kanalstruktur und einen Polymervernetzungsgrad entsprechend 8-0,5 Masseanteilen in % Divinylbenzol-Gehalt aufweisen.
27. Meßvorrichtung nach Anspruch 1 und 21-26, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Reagensträger Kugelform besitzt.
28. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger ein Indikationssystem oder eine den Analyt erkennende und seine Umsetzung katalysierende Biokomponente (Reagensphasen-Grundtyp a) immobilisiert ist.
29. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger eine den Analyt erkennende und seine Umsetzung katalysierende Biokomponente und ein Indikatorsystem oder ein Indikatorsystem und eine die Indikatorreaktion katalysierende Biokomponente immobilisiert sind (Reagensphasen-Grundtyp b).
30. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger eine den Analyt erkennende und seine Umsetzung katalysierende Biokomponente, ein Indikatorsystem und eine zweite Biokomponente, die die Indikatorreaktion oder eine Analyt-verändernde Reaktion katalysiert, immobilisiert sind (Reagensphasen-Grundtyp c).
31. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger eine Analyt-affine Biokomponente oder eine Analyt-affine Biokomponente und ein Indikatorsystem immobilisiert sind (Reagensphasen-Grundtyp d).
32. Meßvorrichtung nach Anspruch 28-30, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Analyt erkennende und seine Umsetzung katalysierende Biokomponente ein Enzym ist.
33. Meßvorrichtung nach Anspruch 32, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Enzym eine Oxidoreduktase, ein NAD(P)-abhängiges Enzym oder eine Hydrolase ist.
34. Meßvorrichtung nach Anspruch 33, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Oxidoreduktase eine Oxidase, eine Peroxidase oder eine Dehydrogenase ist.
35. Meßvorrichtung nach Anspruch 34, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Oxidase Glucoseoxidase, Uratoxidase, Cholesteroloxidase, Glutamatoxidase, Alkoholoxidase, Cholinoxidase, Sarkosinoxidase, Xanthinoxidase, Aminosäureoxidase, Pyruvatoxidase, Malatoxidase oder Lactatoxidase ist.
36. Meßvorrichtung nach Anspruch 30, **gekennzeichnet dadurch**, daß die zweite Biokomponente, die die Indikatorreaktion katalysiert, eine Peroxidase ist oder die zweite Biokomponente, die eine Analyt-verändernde Reaktion katalysiert, eine Hydrolase ist.
37. Meßvorrichtung nach Anspruch 31, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Analyt-affine Biokomponente ein immunchemisch aktiver Stoff ist.

38. Meßvorrichtung nach Anspruch 37, **gekennzeichnet dadurch**, daß der immunchemisch aktive Stoff eine Antikörperspecies und/oder Antigenspecies oder eine Haptenspecies ist, wobei einer der immunchemisch aktiven Stoffe ein Indikatorsystem enthält.
39. Meßvorrichtung nach Anspruch 28-30, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger als Indikatorsystem ein  $H_2O_2$ -Indikatorsystem oder NAD(P)H oder NAD(P) oder ein Hydrolasesubstrat immobilisiert sind.
40. Meßvorrichtung nach Anspruch 39, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger als  $H_2O_2$ -Indikatorsystem Redoxmetallionen-(Farb-)Chelate oder p-Phenylendiaminderivate gemäß DD-WP 258474 immobilisiert sind.
41. Meßvorrichtung nach Anspruch 21-27, 29, 34, 35 und 40, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger eine  $H_2O_2$ -bildende Oxidase und ein Redoxmetallionen-Chelat oder eine  $H_2O_2$ -bildende Oxidase und ein p-Phenylendiaminderivat gemäß DD-WP 258474 immobilisiert sind.
42. Meßvorrichtung nach Anspruch 21-27, 30, 33-36 und 40, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger eine  $H_2O_2$ -bildende Oxidase, eine Peroxidase und ein p-Phenylendiaminderivat gemäß DD-WP 258474 immobilisiert sind.
43. Meßvorrichtung nach Anspruch 21-27, 29, 30, 33-36 und 39, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger eine Cholesterolesterase und/oder Cholesteroxidase und ein ( $H_2O_2$ ) Indikatorsystem immobilisiert sind.
44. Meßvorrichtung nach Anspruch 21-27, 31, 37, 38 und 40, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf dem Reagensträger ein p-Phenylendiaminderivat gemäß DD-WP 258474 und ein immunchemisch aktiver Stoff mit  $H_2O_2$ -bildendem Markerenzym oder ein immunchemisch komplementäres Stoffpaar mit einem  $H_2O_2$ -bildenden Markerenzym an einem der immunchemisch aktiven Stoffe immobilisiert sind.

Hierzu 9 Seiten Zeichnungen

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine faseroptische Meßvorrichtung, die insbesondere auf Gebieten angewendet wird, wo Stoffkonzentrationen zu vermessen sind. Als Einsatzgebiet kommen insbesondere die medizinische Diagnostik, z. B. bei In-vivo- oder In-vitro-Messungen, aber auch die Umwelt- bzw. Nahrungsmittelanalytik, die chemische bzw. biotechnologische Prozeßkontrolle in Frage.

#### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Entwicklung von optischen (Bio-)Sensoren geht im wesentlichen in zwei Zielrichtungen:

1. zu miniaturisierten Meßfühlern für In-vivo- bzw. In-vitro-Messungen auf dem Gebiet der medizinischen Diagnostik oder für In-situ-Messungen bei der chemischen bzw. biotechnologischen Prozeßkontrolle und
  2. zu Durchflußmeßzellen für Fließinjektionsanalysen (FIA)-Geräten.
- Die bekannten Sensorkonzepte basieren auf dem Prinzip, daß meist eine polymere oder makromolekulare Reagensphase, z. B. in Form einer Schicht, einer Membran oder einer Indikatorreaktionskammer, an der Spitze (am Ende) oder am Ort der internen Reflexion einer Faseroptik fest fixiert ist. Die Reagensphase enthält eine Biokomponente, z. B. eine Enzymspecies, eine Antikörperspecies u. a. und/oder ein Indikatorsystem. Dementsprechend sind die bisher bekanntgewordenen optischen Sensoren durch unterschiedliche Reagensphasenformen und durch die Art ihrer festen Fixierung an die Faseroptik charakterisiert (vgl. z. B. AT 377612, AT 382467, AT 385360, AT 387466 oder s. z. B. bei O. S. WOLFBEIS, „Fibre-optic sensors in biomedical sciences“, Pure and Appl. Chem. 59, 663 [1987]; W. R. SEITZ, „Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics“, CRC Critical Reviews Anal. Chem., Vol. 19, 135 ff. [1988]; A. J. GUTHRIE u. a. „Optical fibres in chemical sensing – a review“, Trans. Inst. MC, Vol. 9, 71 ff. [1987]).

Die feste Fixierung der Reagensphase an der Faseroptik erweist sich als unvorteilhaft, wenn die analytische Problemstellung im Extremfall nur einmalig bzw. kurzzeitig nutzbare Reagensphasen gestattet, d. h. ein Reagensphasenwechsel nach einer bzw. wenigen Bestimmungsfällen erforderlich ist. Ein solcher Fall liegt häufig vor, z. B. wenn für den zu bestimmenden Analyten nur eine nicht-reversible Indikatorreaktion bekannt ist. Dazu zählen alle Reagenzien-verbrauchenden Indikatorreaktionen und solche, die, wie z. B. immunchemische Reaktionen (Immunosensoren) auf einer „Affinitätsreaktion“ basieren. Der Mangel an Analyt-spezifischen Reagensphasen ist das „Flaschenhals“-Problem der Sensorentwicklung. Dabei bestehen die Schwierigkeiten vor allem darin, Reagensphasen zu entwickeln, die ausschließlich auf die zu bestimmende Stoffkonzentration durch optische Eigenschaftsänderung ansprechen und darüber hinaus die optische Eigenschaftsänderung reversibel ist. Weitere Problembeispiele sind Reagensphasen, die nur kurzzeitig stabile Biokomponenten enthalten, oder auf Grund von Reagenzienauswascheffekten oder durch Analysengut-bedingte optische Störeffekte nach einmaliger bzw. kurzzeitiger Benutzung unbrauchbar werden.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, kostengünstige, faseroptische (Bio-)Sensor-Prototypen zu entwickeln, die miniaturisierbar sind und eine Analyt-spezifische und auswechselbare Reagensphase aufweisen.

## Darstellung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine faseroptische Meßvorrichtung zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen, bestehend aus Faseroptik und Reagensphase, optisch gekoppelt in einer Meßanordnung mit einer Lichtmeßeinrichtung, welche die Strahlungsquelle(n), Lichtempfängeranordnung und Registriereinrichtung umfaßt. Die erfindungsgemäße faseroptische Meßvorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß

- mindestens eine Faseroptik und mindestens eine Reagensphase ein optisches System bilden,
- die Reagensphase optisch wirksames Element und/oder fluoreszierendes Element innerhalb des optischen Systems ist,
- die Reagensphase bei Einwirkung des Analyten ihre optischen Übertragungseigenschaften und/oder ihre Lumineszenzeigenschaften ändert,
- die Reagensphase aus einem Reagensträger oder aus Reagensträger, immobilisierte(n) Biokomponente(n) und/oder Indikatorsystem besteht
- die Reagensphase in der faseroptischen Meßvorrichtung austauschbar positioniert ist,
- ihre Positionierung reproduzierbar ist.

Eine bevorzugte Ausführungsvariante der faseroptischen Meßvorrichtung ist ein miniaturisierter, gegebenenfalls sterilisierbarer, Meßfühler, der nach Austausch der Reagensphase oder der Reagensphase und Teilen des optischen Systems den erneuten Einsatz des Meßfühlers gestattet. Die Erfindung stellt eine Prinziplösung für faseroptische Sensor-Prototypen mit auswechselbarer Reagensphase dar.

Die Bereitung der erfindungsgemäßen Reagensphasen erfolgt ausgehend von optisch wirksamen Reagensträger-Formen, z. B. in Linsen- oder Prismenform, durch Immobilisierung einer oder mehrerer Biokomponenten, die durch den Analyt vorgegeben sind, und/oder eines Indikatorsystems. Als Reagensträger kommen z. B. organische Polymere oder makromolekulare Verbindungen zum Einsatz, die von vornherein optisch wirksame Formen, z. B. Kugellinsen, bilden können, und die eine Aufnahmefähigkeit für Biokomponenten und/oder für Indikatorsysteme aufweisen. Anwendung finden Polymere, wie Polystyrol-derivate, Polyacrylnitrile, Poly(meth)acrylate, Poly(meth)acrylamide, Polyäthylene, Polyvinylalkohole u. a. oder makromolekulare Verbindungen, wie Kollagene, Polysaccharid-derivate, Epoxidharze u. a. Die Reagensträger werden in Kugellinsen-Form vorzugsweise mit einem Durchmesser von 0,5 bis 2 mm eingesetzt. Die Reagensphasen-Abmessung kann, je nach Erfordernis hinsichtlich des Miniaturisierungsgrades auch kleiner als 0,5 mm oder größer als 2 mm sein. Erfindungsgemäß werden bevorzugt Polystyrol-derivat-Kugeln oder  $\text{NH}_2$ - bzw. OH-funktionalisierte Glaskugeln als Reagensträger eingesetzt, weil diese Verbindungen folgende Vorteile in sich vereinen:

- Immobilisierungsmöglichkeit von Biokomponenten und/oder Indikatorsystemen,
- Möglichkeit der Bildung von Formen, wie Kugellinsen, mit optisch wirksamen Eigenschaften, wie z. B. Kollimationseigenschaften,
- bei stabiler und reproduzierbarer Positionierungsmöglichkeit unter optischen Kopplungsbedingungen (auch bei hohem Miniaturisierungsgrad), z. B. in Kombination mit Faseroptiken,
- geringe Herstellungskosten.

Die Vorbereitung der Reagensphasen-Glaskugeln für den erfindungsgemäßen Einsatz erfolgt ausgehend von  $\text{NH}_2$ - oder OH-funktionalisierten Glaskugeln unter Anwendung der für Gläser üblichen Immobilisierungspraktiken, z. B. über eine Aminopropyltriäthoxysilanisierung, zwecks Fixierung von Biokomponenten und/oder von Indikatorsystemen. Bei der erfindungsgemäßen Anwendung von Reagensphasen auf der Grundlage von Polystyrol-derivaten erweist sich als vorteilhaft, wenn man bei Gel- oder Kanalstruktur der Formkörper, vorzugsweise Kugellinsen, von unterschiedlichen Polymer-Vernetzungsgraden ausgeht. Der Vernetzungsgrad kann je nach analytischer Problemstellung bzw. Molekülgröße der zu immobilisierenden Stoffe einem 8 bis 0,5 Massenanteilen in % Divinylbenzol(DVB)-Gehalt entsprechen. Dabei werden Polystyrole mit vorzugsweise folgenden chemischen Modifizierungen eingesetzt:

- Polystyrole mit
- Sulfonsäure- und/oder Carbonsäure-Gruppierungen bzw. anderen elektrisch negativ geladenen Gruppierungen und/oder aromatischen bzw. aliphatischen  $\text{NH}_2$ -Gruppierungen (bei einer Spacergruppenlänge entsprechend 1 bis 10 C-Atomen),
- Ammonium- $(\text{NH}_4^+)$ -Gruppierungen oder anderen elektrisch positiv geladenen Gruppierungen und/oder aromatischen bzw. aliphatischen  $\text{NH}_2$ -Gruppierungen, wie oben angeführt.

Aber auch unterschiedlich vernetzte Polystyrol-derivate, die z. B. OH- oder  $-\text{CH}_2\text{-Cl}$ -Gruppierungen enthalten, werden eingesetzt. Bei der Bereitung der erfindungsgemäßen Reagensphasen werden in Abhängigkeit von strukturellen Gegebenheiten der zu immobilisierenden Stoffe und der eingesetzten Reagensträger die üblichen Immobilisierungspraktiken, wie adsorptive oder elektrostatische Beladung, Immersion oder kovalente Immobilisierungsreaktion angewendet. Dabei werden die Reagensphasen ausgehend von den Reagensträgerkugeln (P) als Grundbaustein, von Biokomponenten und/oder Indikatorsystemen weitgehend nach dem „Baukasten“-Prinzip bereitet und die Reagensphasen als optisch wirksames „Wegwerf“-Element in einem Meßvorrichtungs-Prototyp (s. Fig. 6 und 7) nach dem „Baukasten“-Prinzip angewendet. Die faseroptische Meßvorrichtung beinhaltet folgende Reagensphasen-Grundtypen a) bis d):

- a) P (Indikator) oder P (Biokomponente)
- b) P (Indikator, Biokomponente)
- c) P (Indikator, Biokomponente {1}, Biokomponente {2})
- d) P (Analyt-affine Biokomponente) oder

P Analyt-affine Biokomponente, Indikator), wobei P den Reagensträger und der Klammerausdruck den Immobilisierungszustand symbolisieren. So ist der Reagensphasen-Grundtyp a) dadurch gekennzeichnet, daß auf dem

Reagensträger ein Indikatorsystem oder eine den Analyt erkennende und seine Umsetzung katalysierende Biokomponente immobilisiert ist. Beim Reagensphasen-Grundtyp b) sind auf dem Reagensträger eine den Analyt erkennende und seine Umsetzung katalysierende Biokomponente und ein Indikatorsystem oder ein Indikatorsystem und eine die Indikatorreaktion katalysierende Biokomponente immobilisiert. Der Reagensphasen-Grundtyp c) ist dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Reagensträger eine den Analyt erkennende und seine Umsetzung katalysierende Biokomponente  $\rangle 1 \langle$ , ein Indikatorsystem und eine zweite Biokomponente  $\rangle 2 \langle$ , die die Indikatorreaktion oder eine Analyt-verändernde Reaktion katalysiert, immobilisiert sind. Beim Reagensphasen-Grundtyp d) sind auf dem Reagensträger eine Analyt-affine Biokomponente oder eine Analyt-affine Biokomponente und ein Indikatorsystem immobilisiert.

Da es sich bei der erfindungsgemäßen Lösung um faseroptische (Bio)Sensor-Prototypen mit auswechselbarer Reagensphase handelt, können die Indikatorreaktionen prinzipiell reversibel oder nicht reversibel, d. h. unter Verbrauch des Indikators bzw. in einer Affinitätsreaktion, verlaufen. Dementsprechend werden die Reagensphasen-Grundtypen a) bis d), vorzugsweise in Kugellinsenform, unter Verwendung einer beliebigen Indikatorreaktion eingesetzt. Beispielsweise finden Anwendung

- $H_2O_2$ -Indikatorsysteme bei optischer Eigenschaftsänderung durch  $\lambda$ -abhängige Lichtschwächung oder Lumineszenz
- NAD(P)H oder NAD(P) als Indikatorsystem bei  $\lambda$ -abhängiger ( $\lambda = 340, 360 \text{ nm}$ ) optischer Eigenschaftsänderung oder Lumineszenz oder
- optisch vermeßbare Hydrolasensubstrate bei  $\lambda$ -abhängiger optischer Eigenschaftsänderung oder gegebenenfalls Lumineszenz u. a.

Die bei den Reagensphasen-Grundtypen a) bis c) gegebenenfalls eingesetzten Biokomponenten dienen nach bekanntem Funktionsprinzip eines Biosensors der „Analyt-Erkennung“ (Nutzung des Biokomplementaritäts-Prinzips), d. h., die Biokomponente ist durch den Analyt vorgegeben. Anwendung finden beispielsweise Enzyme, wie Oxidoreduktasen, NAD(P)-abhängige Enzyme oder Hydrolasen, die den Analyt als ihr Substrat „erkennen“, seine Umsetzung katalysieren und dabei gegebenenfalls durch eine nachfolgende Indikatorreaktion eine optische Eigenschaftsänderung oder eine Lumineszenz erzeugen oder löschen.

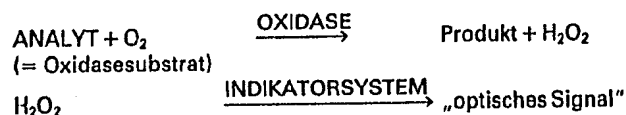
Als Oxidoreduktasen werden z. B. Peroxidasen oder Oxidasen, z. B.  $H_2O_2$ -bildende Oxidasen, eingesetzt. Letztere katalysieren die Umsetzung ihrer Substrate (= Analyte), wie z. B. Glucose, Harnsäure, Cholesterol, Glutamat, Alkohol, Cholin, Sarkosin, Xanthin, Aminosäuren, Pyruvat, Malat, Lactat, Cytochrom, wobei ein entsprechendes Produkt und  $H_2O_2$  gebildet werden. Des weiteren werden als Oxidoreduktasen Dehydrogenasen eingesetzt, die die Umsetzung entsprechender Substrate (= Analyte), wie z. B. Alkohol, Lactat, Malat, Isocitrat, unter Bildung von Produkt und NAD(P) oder NAD(P)H katalysieren.

Im Reagensphasen-Grundtyp c) kommen als zweite Biokomponente Hydrolasen, z. B. Esterasen, als Analyt-verändernde Enzyme zum Einsatz, wobei ein entsprechender Analyt z. B. aus seinem für eine Nachweisreaktion unzugänglichen Ester freigesetzt wird. So werden im Reagensphasen-Grundtyp c) als Analyt-verändernde Biokomponente z. B. Cholesterolesterase und als Analyterkennende Biokomponente Cholesteroxidase in Verbindung mit einem  $H_2O_2$ -Indikatorsystem eingesetzt. Andernfalls dient im Reagensphasen-Grundtyp c) eine zweite Biokomponente als Katalysator der Indikatorreaktion, z. B. Peroxidase-katalysierte  $H_2O_2$ -Indikatorreaktion, während eine Oxidase als Analyt-erkennende Biokomponente durch Umsetzung des entsprechenden Oxidessubstrates (als Analyt)  $H_2O_2$  erzeugt.

Reagensphasen-Varianten, wie P (Indikator), des Grundtyps a) werden gegebenenfalls unter Zusatz einer Biokomponente zum Analysengut und im Falle P (Biokomponente), gegebenenfalls unter Zusatz eines Indikatorsystems zum Analysengut bei der Bestimmung von Analyten angewendet, die Substrate der eingesetzten Biokomponente sind. Weiterhin erfolgt bei Einsatz der Reagensphasen-Variante P (Indikator) und unter Zusatz eines Enzymsubstrats, z. B. Lactat, die Bestimmung des entsprechenden Enzyms, z. B. Lactatdehydrogenase. Eine Reagensphase entsprechend P (Indikator) wird auch für die Bestimmung z. B. einer Hydrolase verwendet, wenn als Indikator ein entsprechendes optisch vermeßbares Hydrolasensubstrat eingesetzt wird.

Im Falle des Einsatzes von Reagensphasen-Grundtyp d) finden Analyt-affine Biokomponenten Anwendung, die z. B. immunchemisch aktive Stoffe, wie Antikörperspecies (Ak), Antigenspecies (Ag) oder Haptenspecies (Hp) sind und in einer Affinitätsreaktion das jeweilige Immunchemische Komplement ( $Ak \rightarrow Ag$  oder  $Hp \rightarrow Ak$ ) als Analyt erkennen und binden, was bei Anwendung der immunchemisch üblichen Indikatorprinzipien, wie z. B. Fluoreszenzmarker bzw. Enzymmarker/Indikatorsystem oder Protein-(Tryptophanrest-)inherente Fluoreszenzanregung an Ak und/oder Ag, analytkonzentrationsabhängig optisch signalisiert wird. So können auf dem Reagensträger ein p-Phenylendiaminderivat gemäß DD-WP 258474 und ein immunchemisch aktiver Stoff mit  $H_2O_2$ -bildendem Markerenzym oder ein immunchemisch komplementäres Stoffpaar mit einem  $H_2O_2$ -bildenden Markerenzym an einem der immunchemisch aktiven Stoffe immobilisiert sein. Die meisten der bekannten Indikatorreaktionen verlaufen nicht reversibel, was ein Auswechseln der Reagensphase nach einmaligem oder mehrmaligem Gebrauch erfordert. Gegebenfalls sind die Reagensphasen regenerierbar. Letzteres kann im Falle einer Redox-Indikatorreaktion, z. B. bei Einsatz eines  $H_2O_2$ -Indikatorsystems erfolgen, wo die Reagensphase durch eine geeignete Redoxreaktion (in der faseroptischen Meßvorrichtung oder außerhalb) nach dem Gebrauch in den Meßausgangszustand überführt wird. Eine Reagensphasen-Regenerierung ist jedoch von Fall zu Fall unzweckmäßig. Die Erfindung schließt selbstverständlich auch den Einsatz von Reagensphasen ein, die auf einer „reversiblen“ Indikatorreaktion basieren. Beispielsweise sind Reagensphasen des Grundtyps a) bei Einsatz bekannter pH-Indikatoren für die pH-Anzeige anwendbar. Ebenfalls werden  $O_2$ -Indikatoren, die auf dem bekannten Fluoreszenzlösungs-Prinzip basieren, in Form der Reagensphasen-Grundtypen a) bis c) für die Bestimmung  $O_2$ -verbrauchender Systeme, z. B. Oxidase/Substrat-Systeme, angewendet. Das der Erfindung zugrundeliegende Prinzip soll im folgenden anhand von Ausführungsvarianten näher erläutert werden.

Beispielsweise werden Reagensphasen nach DD-WP 258474, oder Reagensphasen, die auf der Anwendung Reagensträger-immobilisierter Redoxmetallionen-(Farb-)Chelaten basieren, für die faseroptische Bestimmung entsprechender Redoxanalyte oder in Kombination mit einer  $H_2O_2$ -bildenden Oxidase zur Bestimmung von Oxidasesubstraten eingesetzt. Die Bestimmung verläuft nach folgendem Reaktionsschema:



Dabei werden Reagensphasen, die auf der Anwendung von Redoxmetallionen- (Farb-) Chelaten basieren, aus chemisch reaktiven oder elektrisch geladenen Chelatderivaten und entsprechend reaktiven oder elektrisch entgegengesetzt geladenen Reagensträgern oder durch eine andere geeignete bekannte Immobilisierungsprozedur bereitet. Reagensphasen nach DD-WP 258474 bestehen im wesentlichen aus Reagensträger immobilisierten p-Phenylendiaminderivaten oder deren oxidativen Kupplungsprodukten. Dabei werden vorzugsweise Polystyrolderivat-Kugeln als Reagensträger eingesetzt. Beispielsweise werden Reagensphasen nach Typ a im einfachsten Falle aus einem Gemisch von Polystyrolderivat-Kugeln (Durchmesser: 0,5 bis 2 mm) mit negativ geladenen Gruppen, z. B.  $-\text{SO}_3^-$ , und einer 1 bis 100 mmolaren Lösung von N,N-disubstituiertem p-Phenylendiamoniumderivat (der Formel III in DD 258474) in z. B. 0,2 n Na-acetat-Puffer (pH 4) nach 30 bis 90 Minuten Schütteln erhalten.

Die Reagensphasen werden erfindungsgemäß für die Bestimmung von Redoxanalyten, wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder ein  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bildendes System, z. B. ein Oxidasesubstrat unter Oxidase-Zusatz zum Analysengut, eingesetzt. Eine Ausführungsvariante des Reagensphasen-Grundtyps a) ist die, daß auf dem Reagensträger ein  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Indikatorsystem, z. B. ein Redoxmetallionen-Chelat oder ein p-Phenylendiaminderivat gemäß DD-WP 258474 immobilisiert ist. Bei einer Ausführungsvariante des Reagensphasen-Grundtyps b) ist auf dem Reagensträger eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bildende Oxidase und ein Redoxmetallionen-Chelat oder eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bildende Oxidase und ein p-Phenylendiaminderivat gemäß DD-WP 258474 immobilisiert. Die Bereitung einer Reagensphase nach Typ b erfolgt ausgehend von Polystyrolderivat-Kugeln, die (wie oben beschrieben) mit einer 5 bis 100 mmolaren N,N-disubstituierten p-Phenylendiamoniumderivat-Lösung behandelt wurden, durch nachfolgende 1- bis 2stündige Behandlung mit einer Oxidase-Lösung, z. B. Glucoseoxidase- (GOD-) Lösung (1000 U/ml), in Wasser. Die dabei pro Reagensphase erzielte Enzymaktivität hängt außer von der Enzymspecies wesentlich vom Polymer-Vernetzungsgrad des Polystyrolderivates und von weiteren strukturellen Gegebenheiten sowie vom p-Phenylendiaminderivat-Gehalt der Reagensphasen-Kugeln ab.

Schließlich läßt sich ausgehend vom Reagensphasen-Grundtyp b) auch Reagensphasen-Grundtyp c) durch Behandlung mit einer Peroxidase-Lösung (500 U/ml) in Wasser bereiten. Reagensphasen des Grundtyps c) lassen sich auch bereiten, wenn man den Reagensphasen-Grundtyp a), der ein p-Phenylendiaminderivat enthält, zuerst mit Peroxidase (Reagensphasen-Grundtyp b)) und anschließend mit einer Oxidase-Lösung, z. B. Glucoseoxidase-Lösung, behandelt. Damit liegen, wie für das Beispiel Enzym beschrieben, folgende Reagensphasen-Varianten vor:

- 1.) P (Ind.) oder P (Oxidase)
- 2.) P (Ind., Oxidase)
- 3.) P (Ind., Peroxidase)
- 4.) P (Ind., Oxidase, Peroxidase), wobei Ind. ein  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Indikatorsystem symbolisiert.

Die Reagensphasen-Varianten 1 bis 4 werden prinzipiell für die Bestimmung von Analyten, die Oxidasensubstrate sind oder die z. B. durch ein Analyt-veränderndes Enzym zu einem Oxidasensubstrat umgesetzt werden, eingesetzt (s. Beispiele 4 und 5). Dabei ist im Falle der Varianten P (Indikator) und P (Indikator, Peroxidase) der Zusatz einer entsprechenden Oxidase zum Analysengut erforderlich.

Die Varianten P (Indikator) und P (Indikator, Peroxidase) werden unter Zusatz eines jeweiligen Oxidasensubstrats zum Analysengut auch für die Bestimmung entsprechender Oxidasen angewendet. Bei Einsatz der Varianten 3 und 4, die Peroxidase enthalten, verläuft die Indikatorreaktion auf Grund der Peroxidase-Katalyse erheblich schneller vergleichsweise zu den Varianten 1.) und 2.). Die Reagensphasen-Varianten 1.) bis 4.), die auf der Grundlage des DD-WP 258474 bereitet werden, sprechen bei  $\lambda = 520$  und  $560$  nm auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. Oxidasensubstrat-Konzentrationen durch Lichtschwächung und durch eine Lumineszenzlöschung der Reagensphase an. Die Reagensphasen sind durch kurze Behandlung mit einem geeigneten Reduktionsmittel, z. B. Ascorbinsäure, leicht regenerierbar und dann für einen erneuten Einsatz bereit.

Wie für das Glucoseoxidase/Glucose-Systembeispiel beschrieben, werden ausgehend von den oben angeführten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Indikatorsystemen analoge Reagensphasen-Varianten 1.) bis 4.) für weitere, oben genannte Oxidase/Substrat-Systeme nach dem „Baukasten“-Prinzip bereitet und erfindungsgemäß eingesetzt.

Mit den beschriebenen Reagensphasen liegt im Sinne der Optik ein Material vor, das die optischen Eigenschaften, z. B. Absorption, Brechungsindex, Polarisation und eingeschränkt auch Volumenänderung, bei Einwirkung des Analyten ändern kann, das aber auch unter Einwirkung von Licht oder auf chemischem Wege Lumineszenz zeigen kann. Daher ist es einer der erfindungsgemäßen Grundgedanken, der Reagensphase eine Form zu geben, daß sie mit ihren veränderlichen Eigenschaften allein oder in einer Kombination mit anderen optischen Elementen die Übertragungseigenschaften des damit gebildeten optischen Systems, das durch eine (einkoppelnde) Faseroptik mit Licht versorgt wird, verändert und daß diese geänderten Übertragungseigenschaften durch eine geeignete Meßanordnung als optische Signalstärke vermessen werden. Die Kombination der Reagensphase mit anderen optischen Elementen, wie Linsen, holographische Linsen, kann z. B. zwischen Reagensphase und einkoppelnder und/oder auskoppelter Faseroptik erfolgen. Des weiteren weist das optische System z. B. im Falle der Ausführungsvarianten nach Fig. 6 und 7 ein Reflexionselement, wie einen Spiegel oder ein an einem Ende verspiegeltes Faseroptikstück, auf. Als Faseroptik werden übliche (Quarz-) Glasfasern oder Kunststofffasern sowie Gradientenfasern, Faserbündel oder Hohlfaserbündel verwendet.

Die Reagensphase wird vorzugsweise als Transmissionselement eingesetzt. Dabei sind folgende Formen für die Reagensphase geeignet: Linse, Prisma mit Entartung zur Planplatte oder eine Phasenrelieffitterstruktur sowohl für die Ausbreitung von Raum- als auch von Schichtmoden.

Unter den verschiedenen Linsenformen sind vorteilhaft Kugellinsen zu verwenden, da sie bei beabsichtigter Miniaturisierung klein und kostengünstig hergestellt werden können und bei den Aperturen üblicher Faseroptiken noch keinen allzu großen Öffnungsfehler aufweisen. Prismen sowie Transmissionsgitter mit hinterlegtem Spiegel sind etwas weniger kostengünstig als Kugeln herzustellen, sie eröffnen aber die Möglichkeit, einfallende Strahlung spektral zu zerlegen und die verschiedenen Farben auf verschiedene Meßkanäle zu verteilen. Die nachweisspezifische Wirkung der Reagensphase beeinflusst dabei die Spektralverteilung. Fig. 3-5 zeigen Prinzipskizzen ausgewählter optisch wirksamer Reagensphasen-Anordnungen. Die Verwendung der Reagensphase in Form einer Kugellinse ist in Fig. 3 erläutert. Das von der erregenden Faseroptik 1 durch deren Endfläche 2 ausgehende Lichtbündel 3 wird durch die als Kugellinse ausgestaltete Reagensphase 4 mit der Hauptebene 5 auf die Oberfläche 6 eines Konkavspiegels mit dem Krümmungsmittelpunkt im Mittelpunkt der Reagensphase 4 abgebildet. Die rückgespiegelte Abbildung ergibt sich wieder auf der Endfläche 2 der Faseroptik 1 und das zurückgeleitete Licht steht nach



Durchlauf durch einen X-Verzweiger als Meßsignal zur Verfügung. Eine Absorptionsänderung infolge Stoffnachweises in 4 macht sich als Intensitätsänderung im Meßsignal bemerkbar. Eine Brechungsindexänderung ist ebenfalls im Meßsignal festzustellen, weil sich die Brechkraft der Linse 4 ändert und die aufeinander folgenden Fehlfokussierungen zuerst von 2 nach 6 und dann von 6 nach 2 das in 1 eingekoppelte Signal erheblich schwächen. Es ist festzustellen, daß die gezeigte Anordnung um den Faktor 4 gegenüber Brechungsindexänderungen empfindlicher ist, als diejenige, die sich ergibt, wenn sich 2 im Brennpunkt von 4 befindet und das bei 6 ankommende kollimierte Bündel durch einen Planspiegel reflektiert wird. In der gezeigten Anordnung ist anstelle von 6 auch ein Planspiegel möglich, aber der Konkavspiegel entlastet die Toleranzforderung bezüglich einer transversalen Verschiebung von 1. Bei gleichzeitiger Messung von Absorption und Brechungsindexänderung ist es vorteilhaft, die Kugellinse 4 von verschiedenen Richtungen und in verschiedenen Abschnitten zu durchstrahlen und die Ergebnisse in getrennten Kanälen aufzuzeichnen. Dann ist 6 durch einen Planspiegel zu ersetzen und in der Ebene von 2 verschiedenen einkoppelnde Kanäle in Form von Faserenden und auch mehrere Kanäle für die Messung des rückgestreuten Lichtes anzuordnen. Bei stärkerer Verspiegelung der Endfläche 2 entsteht beispielsweise zwischen 5 und 1 ein optischer (Laser-) Resonator, dessen Resonanzverhalten sich stark mit den optischen Eigenschaften der Reagensphase 3 ändert, was eine Auswirkung auf das Meßsignal in der Faseroptik 1 hat. Es ist dem Fachmann klar, daß die ganze Vielfalt von Resonatoranordnungen, mit der entsprechenden Form der Reagensphase anstelle des aktiven Mediums eingebracht und über die übliche Gaußstrahlenkopplung an die einkoppelnde Faser angeschlossen, hier Anwendung finden kann. Die optisch wirksame Reagensphasen-Anordnung gemäß Fig. 3 beinhaltet auch die Möglichkeit, daß der Spiegel auf eine auf die Reagensphasenkugel passende Konkav-Konkav-Linse aus lichtdurchlässigem Material, z. B. elastischem Gießharz, aufgebracht ist. Das lichtdurchlässige Material kann auch oder anstelle der Reagensphasenkugel Komponente(n) und/oder Indikatorsystem enthalten. Des weiteren kann die Reagensphase mit der Konkav-Konkav-Linse verbunden sein, oder der Raum zwischen Spiegel 6 und Reagensphase 4 ist mit einer zweiten Reagensphase oder einem elastischen durchsichtigen Harz ausgefüllt, so daß Spiegel 6, Harz und Reagensphase 4 als eine Wegwerfeinheit benutzt werden. In Fig. 4 ist eine Anordnung erläutert, die zweckmäßig ist, wenn die Reagensphase 10 im gesamten Volumen infolge Erregung durch das von der einkoppelnden Faser 7 über die Optik 9, die keine Reagensphase ist, auf 10 gelenkten Lichtes Lumineszenz zeigt.

In Fig. 4 ist die Reagensphase ein Transmissionselement in Form einer Kugel mit Lumineszenzeigenschaften, als Reflexionselement ist ein Spiegel eingebaut, zwischen Reagensphase und einkoppelnder Faseroptik ist ein optisches Element vorhanden, und die Reflexion erfolgt in die einkoppelnde Faseroptik. Der Konkavspiegel 11 reflektiert einen Teil der Lumineszenzstrahlung, die zusammen mit der rückwärts emittierten Strahlung über 9 wieder durch die Endfläche 8 in 7 eingekoppelt wird. Hierbei ist die Reagensphase 10 in den Dimensionen möglichst bis auf den Durchmesser der Faseraustrittsfläche 8 zu verringern, damit ein hoher Lichtleitwert erreicht wird. Die Gestaltung eines Resonators mit einer lumineszierenden Reagensphase kann bis zum Nachweis entsprechender Laserimpulse führen.

Die Verwendung einer als Transmissionsgitter gestalteten Reagensphase 14 ist in Fig. 5 dargestellt. Die Reagensphase 14 ist mit einem Spiegel 15 hinterlegt. Die von der Faseroptik 12 ausgehende Strahlung wird durch die hier als Kugellinse dargestellte Optik 13 kollimiert und an der Kombination Reagensphase 14 und Spiegel 15 durch Beugung spektral zerlegt. Die als kollimierte Bündel verschiedener Richtung vorliegenden Spektralanteile gelangen nach Fokussierung durch 13 hier beispielsweise auf die drei Faseroptiken 16, 17 und 18 mit denen die Meßvorrichtungen für beispielsweise 3 Farben angesteuert werden. Wenn die Reagensphase 14 ihre optischen Eigenschaften ändert, so werden die Kanäle 16, 17 und 18 mit unterschiedlich sich ändernden Intensitäten angesteuert. Damit entfällt die Notwendigkeit des von außen ankommende Licht monochromatisch durchzustimmen. Hier genügt Weißlicht. Die Reagensphase 14 kann selbstverständlich auch als Prisma gestaltet werden. Die spektrale Zerlegung ist auch in Transmission durch die Reagensphase hindurch mit einer zweiten, das Meßsignal aufnehmenden Faseroptik möglich. Es entspricht dem hier dargelegten Prinzip, daß die Rückspiegelung in die einkoppelnde Faseroptik unterlassen werden kann und die optische Abbildung bis in eine das Licht ableitende Faseroptik geführt werden kann. Weiterhin läßt sich mit den Abbildungen ein Nachweis von Polarisationsänderungen verbinden.

Alle angegebenen Prinziplösungen sind auch als zweidimensionale optische Schemata ausführbar in der Form, daß in flächenhaft ausgedehnten Schichtwellenleitern zweidimensionale Linsen, Gitter, Prismen und Wellenleiter nach dem gegenwärtigen Stand der Technik herstellbar sind. Die Reagensphase kann auch als Dünnschichtelement ausgeführt werden. Im Falle der Anwendung eines lumineszierenden Indikatorprinzips kann die Reagensphasenkugel auch aus einem lichtundurchlässigen Material bestehen. Das heißt, dann bildet die Reagensphase kein Transmissionselement, sondern der Analyt bewirkt, gegebenenfalls bei Lichteinstrahlung mittels einkoppelnder Faseroptik, eine Lumineszenzlösung der lumineszierenden Reagensphase, oder der Analyt erzeugt Lumineszenz.

Fig. 6 bzw. 7 stellen eine Lösungsvariante für eine faseroptische Meßvorrichtung in Meßfühlerform bzw. Durchfluß-Meßfühlerform dar, wobei optische Meßanordnungen nach den Prinzipskizzen der Fig. 3 bis 5 angewendet werden. Das Bauprinzip nach Fig. 6 und 7 geht von der Anwendung einer optisch abbildenden Reagensphasenkugel 19 (Durchmesser < 2 mm) aus. Letztere ist nach dem „Wegwerf“-Prinzip auswechselbar und exakt in der optimalen optischen Anordnung bezüglich der Übertragungseigenschaften positioniert, und zwar zwischen einer in einer Metallkanüle 20 befindlichen Faseroptik 21 (kommerzielle „Aderleitung“ 22) und einer an der zweiten Metallkanüle 26 fixierten reflektierenden Ebene 23 (z. B. eine polierte Stirnfläche eines Metallzylinders 24, senkrecht zur optischen Achse, oder ein Konkavspiegel). Beide Metallkanülen sind mittels lösbarer Steckverbindung vom Typ „Siemens“ ineinandergefügt (vgl. Fig. 6), wobei in der Höhe der Reagensphase mindestens zwei Öffnungen 25 (zum Eindringen des Analysengutes) angebracht sind. Zwei Mikro-Spiralfedern 27, vorzugsweise aus Nickel-Titan-Legierung, gestatten, die Reagensphasenkugel ohne Nachjustage einzulegen, so daß kein axialer und Winkelversatz des optischen Strahlenganges durch Umspülen von Flüssigkeiten möglich ist.

Eine stabile Positionierung der Reagensphasenkugel ist durch das Bauprinzip der ineinandergefügten Metallkanülen auch ohne Einlegen in Mikro-Spiralfedern ausreichend gewährleistet. Die reproduzierbare Lage der Reagensphasenkugel 19 wird erreicht durch einseitiges Fügen der Reflexionsfläche 23 mittels Laserschweißverfahrens. Die gegebenenfalls eingesetzte Nickel-Titan-Legierung erweist sich u. a. wegen der Verträglichkeit mit biologischem Material insbesondere bei in-vivo-Messungen als vorteilhaft.



In Fig. 7, wird eine Durchfluß-Meßfühler-Variante (vgl. Ziffern 28–31) gezeigt, die das Vermessen einer Analyt-Konzentrationsänderung nach dem Durchflußprinzip gestattet. Dabei ist die Meßanordnung (vgl. Ziffern 20 bis 27, Fig. 7a) geeignet, in eine Durchflußmeßzelle eingesetzt zu werden. Die Anordnung ist dadurch gekennzeichnet, daß vorzugsweise ein dickwandiges Kunststoffrohr 28 mit einem maximalen Innendurchmesser gleich dem Durchmesser der Öffnungen 25 im Meßfühler (in Höhe der Reagensphase) mit beidseitigen Schlauchanschlüssen 29 (für den Anschluß einer Umwälzpumpe) verwendet wird. Das Kunststoffrohr 28 ist mit zwei gegenüberliegenden Bohrlöchern 31 versehen, deren Durchmesser gleich dem Durchmesser (Nulltoleranz wegen Abdichtung) vom Meßfühler (Kanüle 26) sind. Die Wandstärke der Durchflußzelle (hier Kunststoffrohr) sollte etwa zehnmal größer als der Innendurchmesser sein, damit eine hinreichende mechanische Festigkeit gewährleistet ist. Die einwandfreie Funktionsweise der beschriebenen Meßvorrichtung ist gegeben, wenn der Meßfühler so in den gegenüberliegenden Bohrlöchern positioniert ist, daß die geometrische Achse der Durchflußzelle, d. h. des Kunststoffrohrs, durch die Mitte der gegenüberliegenden Öffnungen (in Höhe der Reagensphase) des Meßfühlers zeigt. Soll prozeßbegleitend die (Licht-) Wellenlängenabhängigkeit für verschiedene Analyte gleichzeitig vermessen werden, so können Durchflußzellen mit senkrecht zu den Achsen von Durchflußzelle und Meßfühler in Höhe des Meßfühlers eingebaute Einblickfenster für Faseroptiken verwendet werden. Die Verwendung von genormten optoelektronischen Bauelementen, wie Steckverbinder, einschließlich Muffen, Strahlenteller, Koppeloptiken und Strahlungsdetektoren, sowie Anregungslichtquellen ermöglichen niedrige Herstellungskosten und bei Einsatz von Impulslichtquellen und entsprechenden elektronischen Bauelementen sind zeitaufgelöste Messungen auch im on-line-Betrieb kostengünstig möglich.

Die Reagensphasen-Kugellinsen kommen jedoch auch in einer einfachen miniaturisierten faseroptischen Meßzelle im Durchlichtbetrieb zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen zum erfindungsgemäßen Einsatz. Beispielsweise lassen sich Oxidasesubstrat-Konzentrationen, wie Glucose- oder Harnsäurekonzentration (vgl. Beispiele 4 und 5) faseroptisch bestimmen, indem die Lichtintensitätsänderung bei  $\lambda_{\text{Max.}} = 520$  oder  $560$  nm, z. B. ausgehend von einer Reagensphasenkugel (s. Beispiel 1 bzw. 2) vom Typ a (Variante 1) oder Typ b (Variante 3) unter Zusatz einer katalytischen Menge der entsprechenden Oxidase, z. B. Glucoseoxidase oder Uratoxidase vermessen wird. Die Meßzelle (maximales Fassungsvermögen:  $150\mu\text{l}$ ) wird z. B. aus Edelstahl angefertigt und besitzt ein Zufluß- und Abflußrohr, was gegebenenfalls auch die Anwendung des Durchfluß-Meßprinzips ermöglicht. In der Meßzelle befindet sich eine Reagensphasen-Kugellinse, z. B. vom Typ a, Durchmesser:  $0,5\text{ mm}$ . Die Reagensphasenkugel ist zwischen zwei sich exakt gegenüberstehenden Kanülenrohren positioniert, so daß die Rohrenden die Kugellinse teilweise umschließen. Eines der Kanülenrohre ist in Richtung der Längsachse federnd gelagert, wodurch ein Auswechseln der Reagensphase möglich wird. In den Kanülenrohren ist je eine Faseroptik (Durchmesser:  $50\mu\text{m}$ ) fixiert, so daß die Faseroptiken an der Reagensphasenkugel als Transmissionselement anliegen, d. h. eine optisch gekoppelte Anordnung vorliegt. Die Anordnung gestattet, die Änderung der Lichtübertragungseigenschaften der Reagensphasenkugel zu bestimmen, indem das mittels einkoppelnder Faseroptik eingestrahlte Licht nach Passieren der Reagensphasenkugel mittels der auskoppelnden Faseroptik (die der einkoppelnden Faseroptik gegenüberliegt) einer Lichtmeßeinrichtung zugeführt wird. Die Lichtmeßeinrichtung besteht im einfachsten Falle aus einer Si-Diode, einem Strommeßgerät und einem y, t-Schreiber. Die analytkonzentrationsabhängige optische Signalstärke wird z. B. durch  $1\text{ g } (I_0/I_t)$  oder  $1\text{ g } (I_0/I_t)/\Delta t$  gebildet, wobei  $I_t$  die Lichtintensität zur Zeit  $t$ ,  $I_0$  die Lichtintensität zur Zeit  $t = 0$  symbolisieren. Zwischen der optischen Signalstärke und der Analytkonzentration liegt eine lineare Beziehung vor (vgl. Beispiele 4 und 5).

Der erfindungsgemäße Reagensphasen angepaßte Meßfühler-Prototyp gestattet bei gegebenenfalls möglicher Sterilisierung den Einsatz bei In-vivo-Messungen. Dabei erweist sich das Bauprinzip, insbesondere durch weitgehende Verwendung von kommerziellen Bauteilen, als kostengünstig. Die miniaturisierten „Wegwerf“-Reagensphasen-Kugellinsen sind geeignet, in faseroptischen Multi-Sensoren bzw. Multi-Dosimetern erfindungsgemäß einzusetzen.

Die erfindungsgemäße faseroptische Meßvorrichtung zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen bietet den Vorteil, daß sie kostengünstig herstellbar ist und darüber hinaus auch in miniaturisierter Form eine Analyt spezifische, optisch wirksame, austauschbare und in ihrer Positionierung reproduzierbare Reagensphase aufweist, wodurch auch nicht reversible Indikatorsysteme ausgenutzt werden können.

### Ausführungsbeispiele

Bestimmung der Glucoseoxidase- (GOD-) Enzymaktivität pro mg Reagensphase:

Reaktionsprinzip:

$\beta\text{-D-Glucose} + \text{Benzochinon} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Glucolaktone} + \text{Hydrochinon}$

Die Hydrochinonbildung pro Minute, die durch Extinktionsänderung bei  $\lambda_{\text{Max.}} = 290\text{ nm}$  (Absorptionskoeffizient =  $2,56\text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ ) angezeigt wird, dient als Maß für die GOD-Enzymaktivität. Als Ausgangslösungen werden eine  $1\text{ mmol/l}$  Glucoselösung bzw. eine  $0,1\%$ ige Chinonlösung jeweils in Mc Ilvaine-Puffer ( $\text{pH} 5,5$ ) eingesetzt.

Bestimmung der Peroxidase-Enzymaktivität pro mg Reagensphase:

Reaktionsprinzip:

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Hydrochinon} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Benzochinon} + 2\text{H}_2\text{O}$

Die Chinonbildung pro Minute, die durch Extinktionsänderung bei  $\lambda_{\text{Max.}} = 245\text{ nm}$  (Absorptionskoeffizient =  $29,6\text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ ) angezeigt wird, dient als Maß für die POD-Enzymaktivität. Als Ausgangslösungen werden eine ca.  $20\text{ mmol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung und eine Hydrochinonlösung in Phosphat-Puffer ( $\text{pH} 6$ ) eingesetzt.

**Beispiel 1** Bereitung von Reagensphasen vom Typ P ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -Indikator)

Ein Gemisch aus  $100\text{ mg}$  Reagensträger-Kugeln ( $\varnothing$  ca.  $0,8\text{ mm}$ ), Polystyrol-derivat mit  $\text{SO}_3$ -Gruppen- und  $0,5\%$  DVB-Gehalt) und  $2\text{ cm}^3$  einer  $10\text{ mmol/l}$ aren N,N-Diäthyl-p-Phenyldiamin-Hydrochlorid-Lösung in  $0,2\text{ mol/l}$ er Na-acetat-Pufferlösung ( $\text{pH} 4$ ) wird  $90\text{ Min.}$  bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden die Kugeln 4 bis 5mal mit bidest. Wasser gewaschen, frei von überschüssigem p-Phenyldiaminderivat-Hydrochlorid. Danach sind die Polystyrol-derivat-Kugeln als Reagensphasen in einer faseroptischen Meßanordnung zur Bestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. Oxidasesubstrat-Konzentrationen (in Kombination mit der entsprechenden Oxidase) einsetzbar.

**Beispiel 2** Bereitung einer Reagensphase vom Typ P(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator, GOD)

Ein Gemisch aus 50 mg Reagensphasen des Typs P(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator), z. B. aus Beispiel 1, und 1 cm<sup>3</sup> einer GOD-Lösung (1000 U/cm<sup>3</sup>) in bidest. Wasser wird 2 Stdn. bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden die Reagensphasen-Kugeln 4 bis 5mal mit bidest. Wasser gewaschen, frei von überschüssiger GOD. Die Polystyrol-derivat-Kugeln, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator und GOD-Enzymaktivität ( $3,0 \times 10^{-1}$  U pro mg Reagensphasen enthalten, sind als Reagensphase) in einer faseroptischen Meßanordnung zur Bestimmung von Glucose-Konzentration einsetzbar.

**Beispiel 3** Bereitung einer Reagensphase vom Typ P(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator, GOD, POD)

Ein Gemisch aus 50 mg Reagensphasen-Kugeln des Typs P(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator, GOD), z. B. aus Beispiel 2, und 1 cm<sup>3</sup> einer POD-Lösung (500 U/cm<sup>3</sup>) in bidest. Wasser wird 2 Stdn. bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden die Reagensphasen-Kugeln 4 bis 5mal mit bidest. Wasser gewaschen, frei von überschüssiger POD. Danach sind die Reagensphasen-Kugeln in einer faseroptischen Meßanordnung zur Bestimmung von Glucose-Konzentrationen einsetzbar.

**Beispiel 4** Faseroptische Bestimmung einer Glucose-Konzentrationsreihe

Die faseroptische Messung erfolgte in einer miniaturisierten Meßzelle (max. Fassungsvermögen: 150 µl), wobei nach jedem Analyt-Konzentrations-Meßwert die Reagensphase in der Meßzelle ausgewechselt wurde.

a) Bei Einsatz von Reagensphasen-Kugeln nach Beispiel 1 (Vernetzungsgrad: 8% DVB-Gehalt), Typ P(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator), wurde die Meßzelle mit jeweils 100 µl einer Glucose-Konzentrationsreihe beschickt, jeweils 20 µl einer GOD-Lösung (16 U/ml) hinzugesetzt und im Durchlichtbetrieb (bei  $\lambda = 560$  nm) die Intensitätsänderung der Lichtübertragung gegen die Zeit vermessen. In Fig. 1 a ist die „optische Signalstärke“ (S) gegen die Glucose-Konzentration dargestellt. Dabei wurde  $S = (\Delta I_0 I_0 / I_1) / \Delta t$  eingesetzt, wobei  $I_0$  die Intensität zur Zeit „t = 0“ und  $I_1$  die Intensität zur Zeit „t“ symbolisieren.

b) Bei Einsatz von Reagensphasen-Kugeln nach Beispiel 2 (Polymer-Vernetzungsgrad: 8% DVB-Gehalt), Typ P(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator, GOD), wurde die Meßzelle mit jeweils 100 µl einer Glucose-Konzentrationsreihe beschickt (ohne GOD-Zusatz zum Analysengut!) und im Durchlichtbetrieb, wie bei Beispiel 4 a angeführt, vermessen und die Meßergebnisse in Fig. 1 b dargestellt.

**Beispiel 5** Faseroptische Bestimmung einer Harnsäure-Konzentrationsreihe

Die faseroptischen Messungen erfolgten in einer miniaturisierten Meßzelle, wie unter Beispiel 4 angeführt.

Bei Einsatz von Reagensphasen-Kugeln nach Beispiel 1 (Polymer-Vernetzungsgrad: 2% DVB-Gehalt), Typ P(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Indikator), wurde die Meßzelle mit jeweils 100 µl einer Harnsäure-Konzentrationsreihe beschickt, 20 µl einer Uratoxidase-Lösung<sup>\*)</sup> (11 U/ml Borax-Lösung, pH 9,2) hinzugesetzt und im Durchlichtbetrieb (bei  $\lambda = 560$  nm) nach der Verfahrensweise, wie unter Beispiel 4 angeführt, vermessen und die Meßergebnisse in Fig. 2 dargestellt.

Prinzipskizzen optisch wirksamer Reagensphasen-Anordnungen

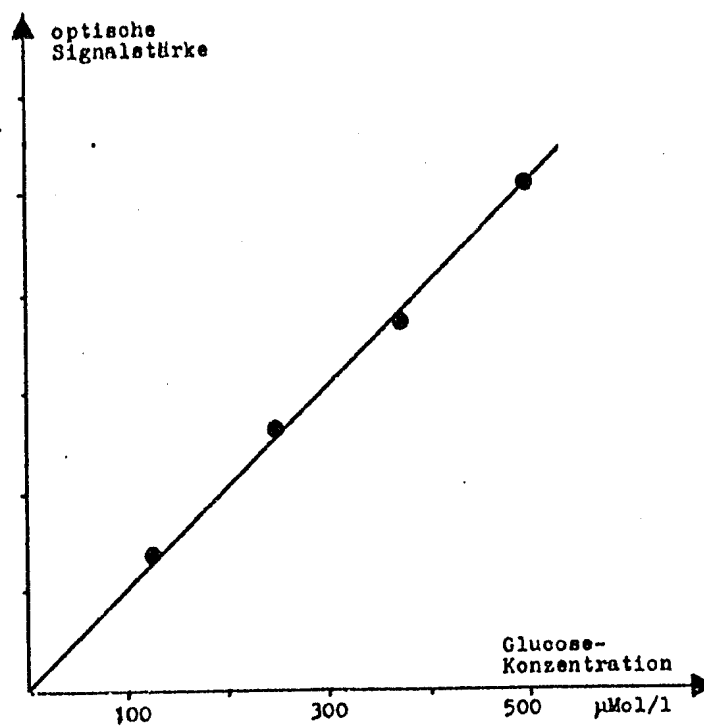
- Fig. 3: 1 Faseroptik  
2 Faseroptik-Endfläche  
3 Lichtbündel  
4 Reagensphase  
5 Hauptebene  
6 Konkavspiegel oder Planspiegel
- Fig. 4: 7 Faseroptik  
8 Faseroptik-Endfläche  
9 optisches Element  
10 Reagensphase  
11 Konkavspiegel
- Fig. 5: 12 einkoppelnde Faseroptik  
13 optisches Element (z. B. Kugellinse)  
14 Reagensphase  
15 Spiegel  
16, 17 und 18 auskoppelnde Faseroptiken
- Fig. 6: 20 Metallkanüle  
21 Faseroptik  
22 kommerzielle „Aderleitung“  
26 Metallkanüle
- Fig. 7 a: 19 Reagensphasen-Kugel  
20 Metallkanüle  
21 Faseroptik  
22 kommerzielle „Aderleitung“  
23 Reflexionsebene  
24 Stirnfläche eines polierten Metallzylinders

<sup>\*)</sup> Uratoxidase pflanzlicher Herkunft, Entwicklungsprodukt des Forschungszentrums für Biotechnologie, Berlin.

25 Öffnung der Metallkanüle 26  
26 Metallkanüle  
27 Mikro-Spiralfedern  
28 Kunststoffrohr  
29 und 30 Schlauchanschlüsse  
31 gegenüberliegende Bohrlöcher  
Fig. 7 b: 19 Reagensphasen-Kugel  
20 Metallkanüle  
21 Faseroptik  
22 kommerzielle „Aderleitung“  
25 Öffnung der Metallkanüle 26  
26 Metallkanüle

Fig. 1a

## FASEROPTISCHE BESTIMMUNG EINER GLUCOSE-KONZENTRATIONSSERIIE

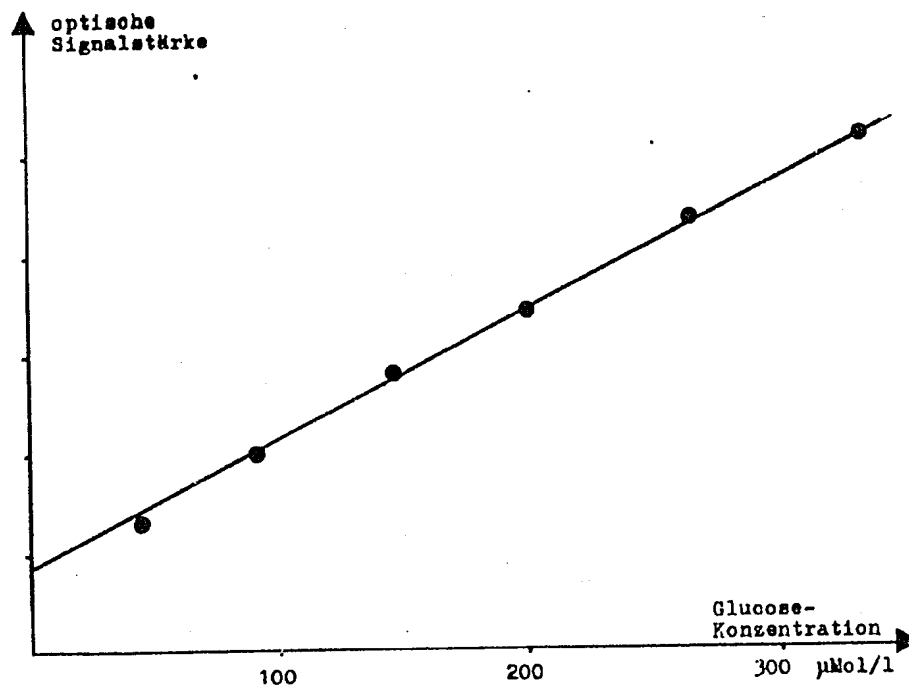


296757

- 12 -

Fig. 1b

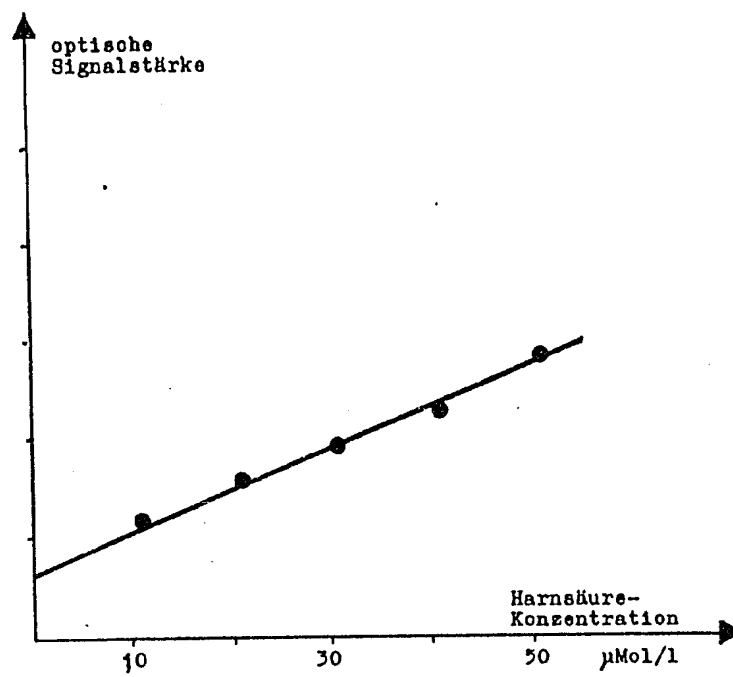
FASEROPTISCHE BESTIMMUNG EINER GLUCOSE-KONZENTRATIONSREIHE



23790-0682000

Fig. 2

FASEROPTISCHE BESTIMMUNG EINER HARNSÄURE-KONZENTRATIONSREIHE



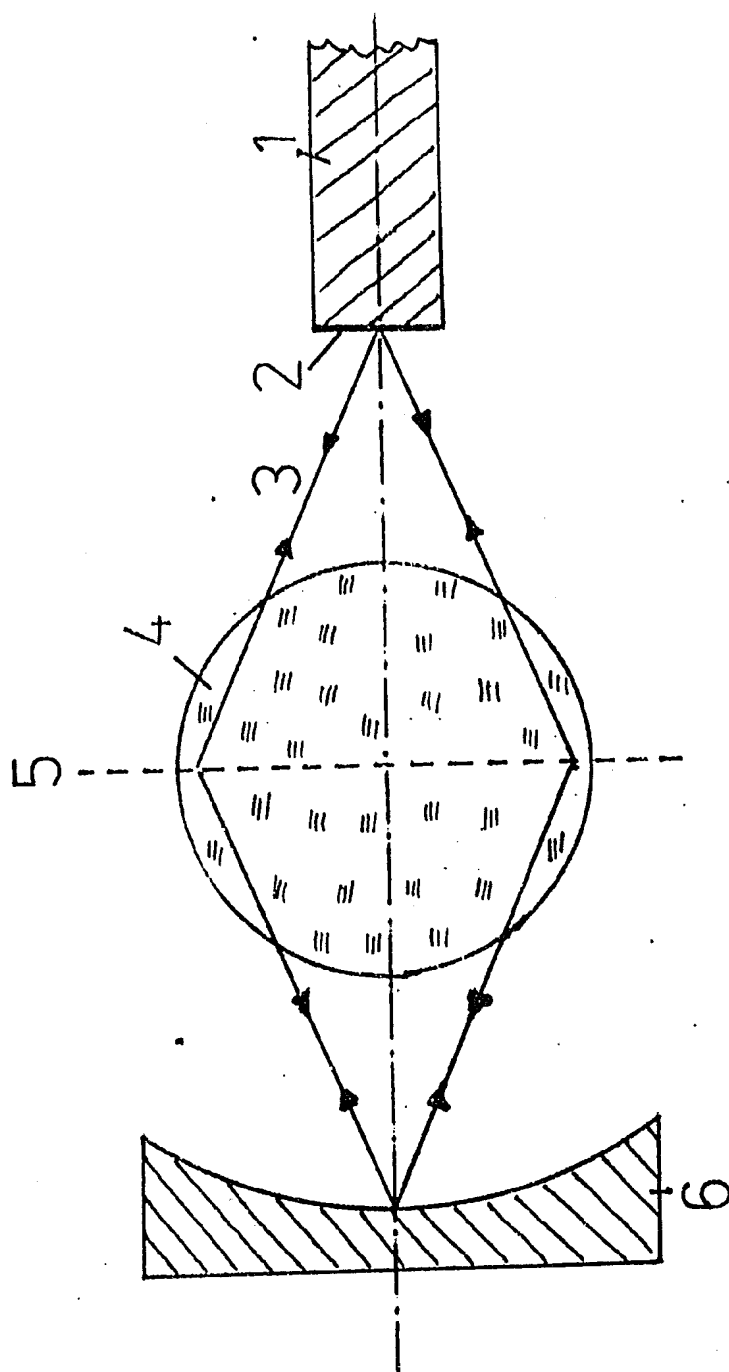


Fig.3



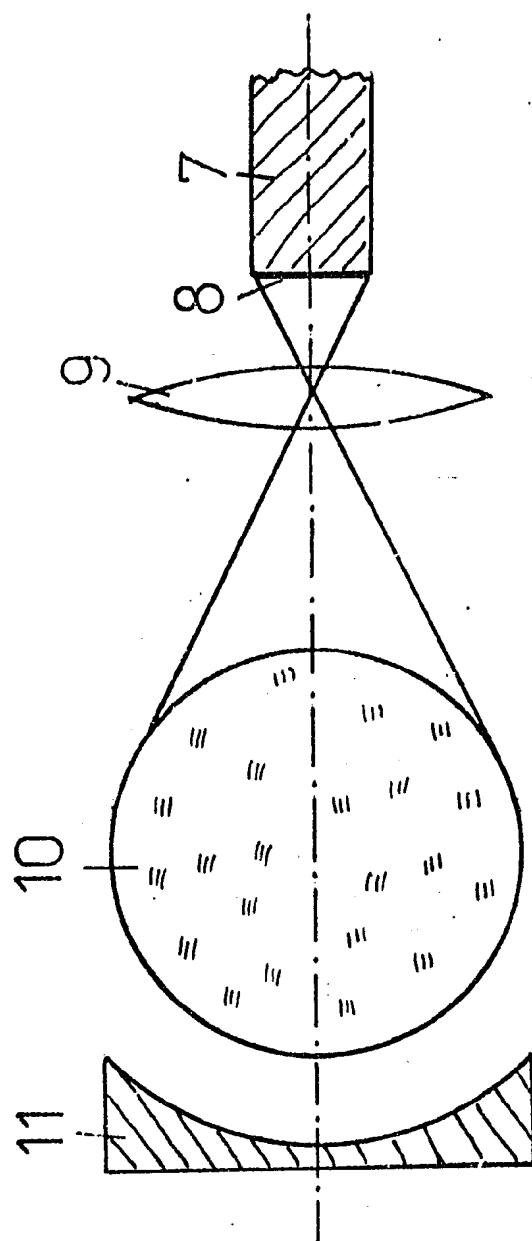


Fig. 4

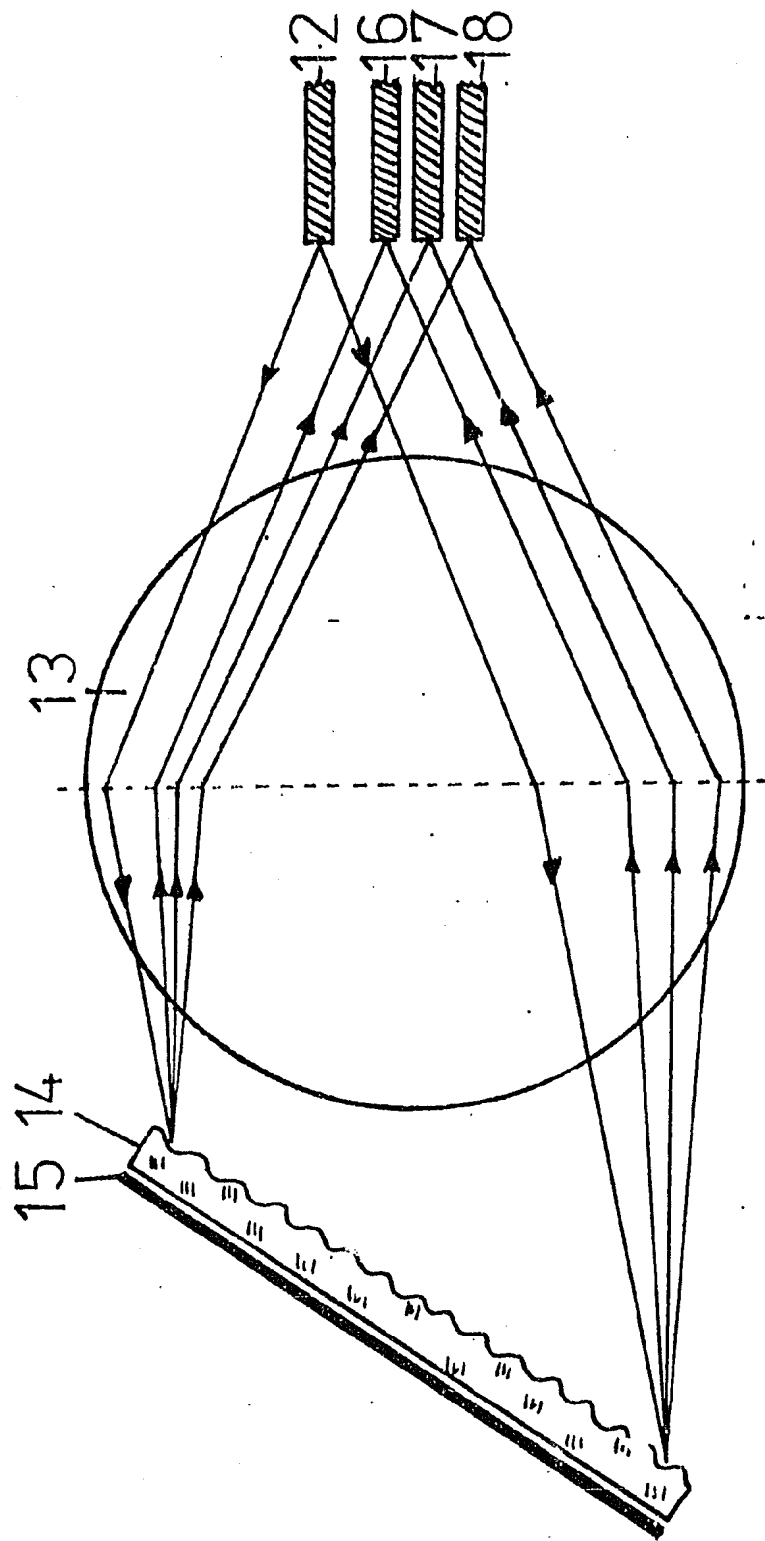
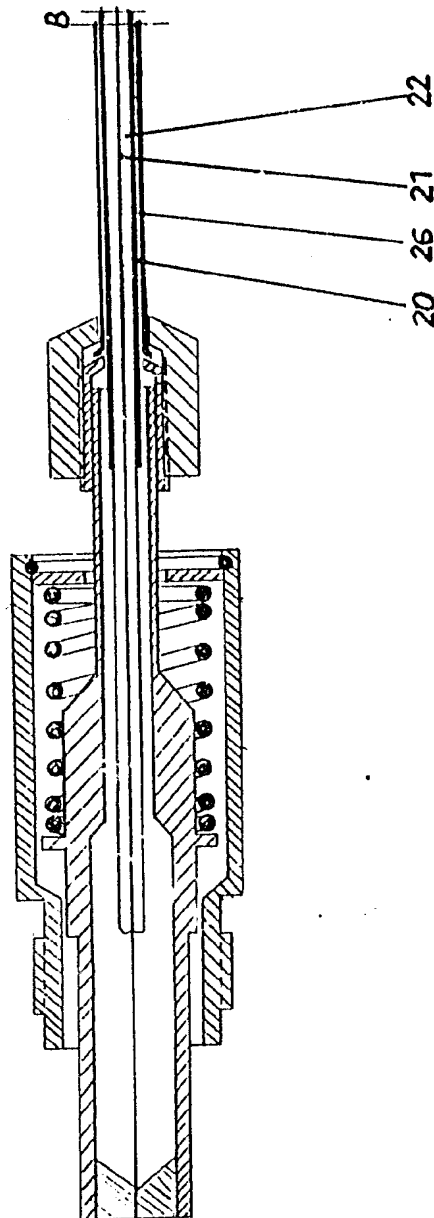
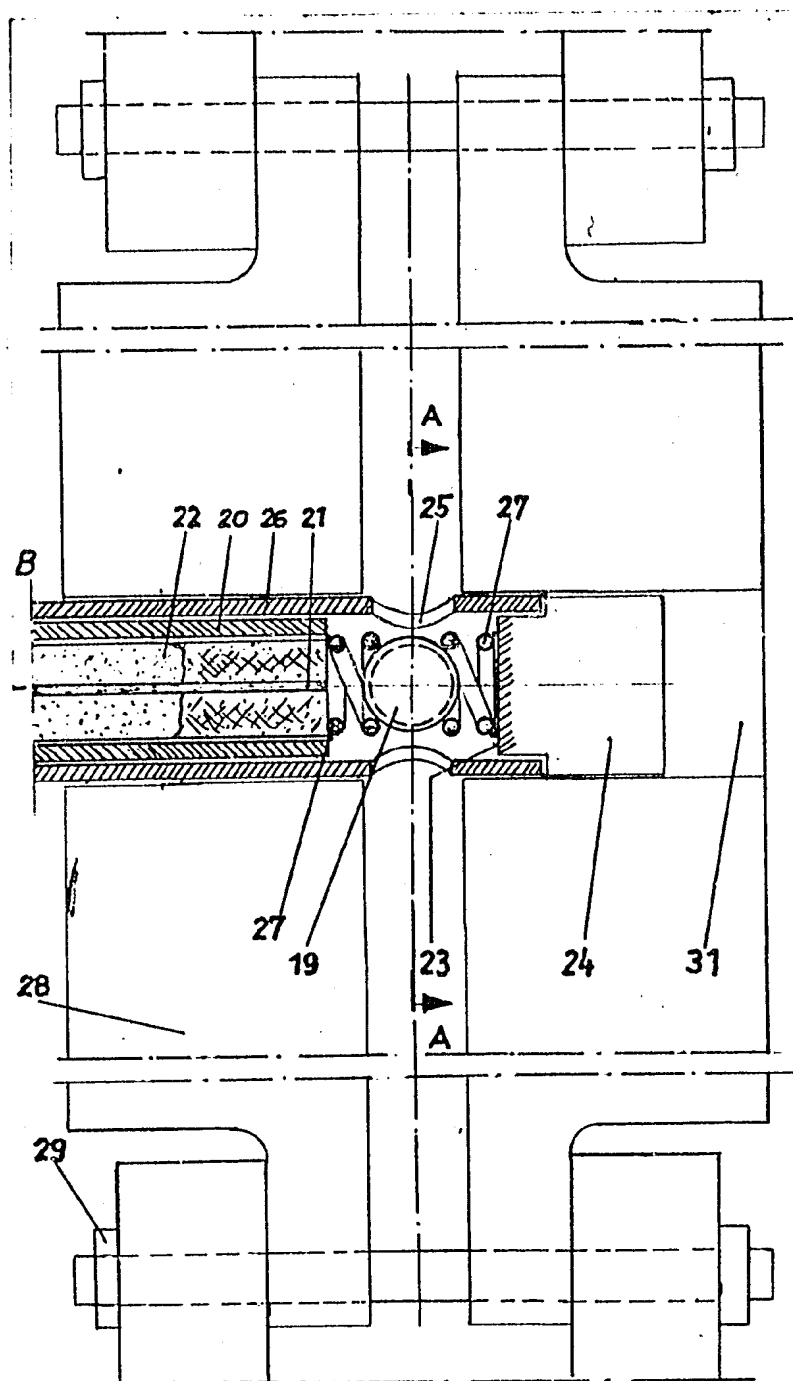


Fig. 5

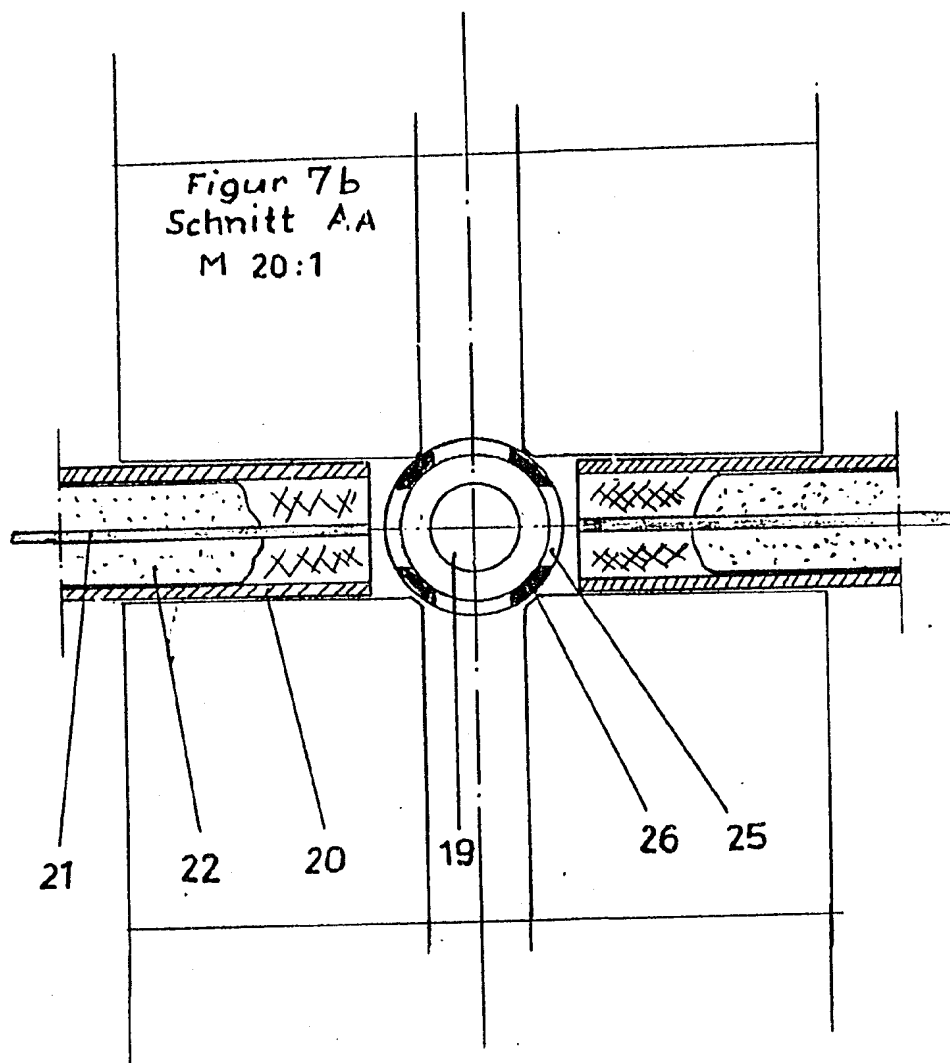
Figur 6  
M 5:1





Figur 7a

M 20:1



L19 ANSWER 116 OF 165 CA COPYRIGHT 2008 ACS on STN

AN 117:3816 CA

OREF 117:787a,790a

TI Reusable fiber-optic sensor

IN Berlin, Peter; Becker, Manfred; Guether, Reiner; Breitfeld, Dagmar; Schwachula, Gerhard; Feistel, Lothar

PA Akademie der Wissenschaften der DDR, Germany

SO Ger. (East), 20 pp.

PI DD 296757 A5 19911212 DD 1990-342978 19900723

PRAI DD 1990-342978 19900723

AB Fiber-optic (bio)sensors are described which contain a reagent phase separable from and optically coupled to the fiber optics, so that the reagent phase can be exchanged or replaced in a reproducible position relative to the fiber optics. The reagent phase contains immobilized biol. components and/or an indicator system, and its optical properties (absorbance, fluorescence, luminescence) change on exposure to the analyte. This arrangement reduces the cost of sensors which utilize irreversible reactions, unstable biol. components, etc., as the reagent phase may comprise a disposable component of the sensor. Thus, a crosslinked sulfated polystyrene bead 0.8 mm in diam. was shaken successively in solns. contg. N,N-diethyl-p-phenylenediamine-HCl (I; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicator) and glucose oxidase, and washed. The bead was placed in a fiber-optic cuvette in which it acted as a lens which, together with a concave mirror, focused light emitted by the optic fiber back onto the tip of the fiber. On addn. of a glucose soln. to the cuvette, the change in absorbance of the bead due to I oxidn. by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed in the glucose oxidase reaction was registered. Various configurations of the reagent phase are illustrated schematically.

DERWENT-ACC-NO: 1992-159919

DERWENT-WEEK: 199220

TITLE: Optical fibre conc. measuring device uses detection of transmission or fluorescence variation caused by reagent

INVENTOR: BECKER M; BERLIN P ; BREITFELD D ; FEISTEL L ; GUETHER R ; SCHWACHULA G

PATENT-ASSIGNEE: AKAD WISSENSCHAFTEN[DEAK]

PRIORITY-DATA: 1990DD-342978 (July 23, 1990)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
--------	----------	----------

DD 296757 A5	December 12, 1991	DE
--------------	-------------------	----

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
--------	-----------------	---------	-----------

DD 296757A5	N/A	1990DD-342978	July 23, 1990
-------------	-----	---------------	---------------

INT-CL-CURRENT:

TYPE	IPC	DATE
------	-----	------

CIPS	G01N21/17	20060101
------	-----------	----------

ABSTRACTED-PUB-NO: DD 296757 A5

BASIC-ABSTRACT:

The conc. measuring device has a reagent phase acting as part of an optical system when its carrier is placed in a defined position within the measuring device, with detection of the variation in the optical transmission characteristics and/or the luminescence characteristics.

USE - For medical diagnosis, analysis of environment or foodstuffs, or chem. or biochemical process control.